

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04836

研究課題名(和文) 虚血ストレスによる臓器障害の時空間的組織修復機構の解明

研究課題名(英文) Spacetime analysis of tissue repair for ischemic organ damage

研究代表者

渋谷 彰 (Shibuya, Akira)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80216027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の心疾患、脳血管疾患による死亡は全死因の中でそれぞれ2番目、3番目であり、医学的、社会的、医療経済的な損失は計り知れない。本研究では、骨髄球系細胞の抑制性免疫受容体であるCD300aの遺伝子欠損マウスでは、マクロファージによるエフェロサイトーシスが亢進し、マウスの脳、心臓、腎臓の虚血再還流モデルにおける臓器障害が軽減することを明らかにした。さらにCD300aに対する中和抗体は、同様にこれらの臓器の虚血再灌流障害を軽減することを示した。これらの結果により、CD300Aを標的とした抗体による虚血性障害の治療の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血により膨大な数の死細胞が生じると、放出されたダメージ関連分子パターンが炎症の悪循環のトリガーとなり、時間経過につれて広範かつ高度な組織障害が成立する(炎症の悪循環)。これは、生命予後や重篤なQOLの低下に直結する。本研究では、虚血によって生じる死細胞をCD300標的としてエフェロサイトーシスを亢進させ効率的に除去することで、炎症の悪循環を断ち切り、組織修復が期待できることを明らかにし、心疾患、脳血管疾患などに対するこれまでにない新しいコンセプトの虚血性疾患の治療法の開発に繋がり、医学、社会、経済のあらゆる面で大きな損失を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cardiac and cerebrovascular diseases are the second and third leading causes of death in Japan, respectively, and the medical, social, and health economic losses are incalculable. In this study, we found that in mice genetically deficient in CD300a, an inhibitory immune receptor of myeloid cells, efferocytosis by macrophages is enhanced, and organ damage is reduced in an ischemia-reflux model of the brain, heart, and kidney in mice. Furthermore, a neutralizing antibody against CD300a was shown to similarly reduce ischemia-reperfusion injury in these organs. These results demonstrate the potential of antibodies targeting CD300A for the treatment of ischemic organ injury.

研究分野：免疫学

キーワード：脳梗塞 心筋梗塞 急性腎障害 マクロファージ エフェロサイトーシス 炎症

1. 研究開始当初の背景

1) 社会的背景

我が国の心疾患、脳血管疾患による死亡は全死因の中でがんに次いでそれぞれ2番目(15.3%)、3番目(8.2%)であり、このうちで主要な疾患である心筋梗塞などの虚血性心疾患による死亡者は6万9,857人、脳梗塞は6万2,128人を数える(厚労省平成29年度「人口動態統計の概況」)。さらに、生存者であっても、それらの後遺症である心不全、神経障害による肉体的、精神的社会的な質(QOL)の低下は著しい。また、これらの医療費の合計は年間1兆4,438億円に上るとされ(同「国民医療費の概況」)、その経済的損失も計り知れない。医学、社会、経済のあらゆる面で、これらの虚血性疾患に対する革新的な治療法の開発が求められている。

近年、動脈内血栓、塞栓による脳梗塞、心筋梗塞などの虚血性疾患に対して血管内カテーテル治療(経皮的冠インターベンション、機械的血栓回収療法)や血栓溶解療法などが広く行われている。しかし、これらは、中核病院でしか行うことができず、また発症後の限られた時間内(golden time)でしか有効でないことから、一部の患者のみしか対象となっていない。さらに、血管内カテーテル治療後の血流再灌流自体が臓器障害を誘導することも問題となっている。また、肝臓、腎臓などの外科手術中の一時的な虚血後の再灌流による臓器障害なども同様である。これらの虚血性疾患の治療や外科手術に伴う虚血再灌流障害に対する有効な予防法、治療法の開発も喫緊の課題である。

2) 学術的背景

ヒトでは生理的な状況下で毎日0.15兆個の細胞がアポトーシスに陥っているとされている。これらの死細胞からは、核酸や種々のダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns; DAMPs)が放出され、自己免疫病や無菌性炎症が誘発されることが明らかとなっている。マクロファージは、死細胞の細胞膜上に露出するフォスファチジルセリン(Phosphatidylserine; PS)を認識するPS受容体を介して死細胞の貪食(エフェロサイトーシス)を行い、死細胞を除去し、核酸やDAMPsの放出を防ぎ、生体のホメオスタシスを維持している。しかし、虚血などの病的な状態によりさらに膨大な数の細胞死が生じると、エフェロサイトーシスによる十分な死細胞除去ができず、放出されたDAMPsが炎症の悪循環のトリガーとなり、時間経過につれて広範かつ高度な組織障害が成立する(炎症の悪循環)(Doran et al, *Nat Rev Immunol*, 2019)。これは、生命予後や重篤なQOLの低下に直結する。したがって、虚血によって生じる死細胞を効率的に除去できれば、炎症の悪循環を断ち切り、組織修復が期待できることから、これまでにない新しいコンセプトの虚血性疾患の予防、治療法となりうる。

2. 研究の目的

脳梗塞では、発症後1～3時間でアストロサイトの細胞死と、これに伴う炎症細胞の浸潤を認め、発症6時間を越えると神経細胞の死が始まる。すなわち、脳虚血後早期の病態は可逆的であるが、虚血が継続しアストロサイトの細胞死と炎症反応が遷延化すると、神経細胞死が誘導され、神経障害の不可逆化が成立する。これらのイベントカスケードの中で、閉塞動脈の直接支配(コア)領域の死細胞から放出されるDAMPsが誘導する炎症反応が、局所におけるイベントカスケードを再増幅させ、神経障害の不可逆化を一層増強していることが推察される。同時に、DAMPsは周辺(ペナンブラ)領域にも波及し、その領域の炎症と細胞死が誘導され、広範な組織障害が成立する。しかし、この神経障害に至る一連のイベントカスケードの時空間的な病理とその分子機構は十分に解明されていない。同様に、心筋虚血、肝臓

虚血、腎臓虚血後の死細胞による時空間的な病理とその分子機構は十分に解明されていない。本研究では、脳、心臓、腎臓の虚血再灌流障害の時空間的病理像とこれらにおけるエフェロサイトーシスの意義と制御による新しい治療法の開発基盤を築く。

3. 研究の方法

(1) 虚血臓器における組織障害の時空間的な病理像とその分子機構の解明

各種臓器(脳, 心臓, 腎臓, 肝臓)の虚血ストレスによって誘導される臓器障害と臓器修復の時空間的分子機構におけるエフェロサイトーシスの病理学的意義について明らかにする。そのために、野生型マウス, CD300a 遺伝子欠損マウスで脳梗塞モデル(MCAO), 心筋梗塞モデル(左前下降枝結索), 腎動脈, 肝動脈結索虚血再灌流モデルをそれぞれ作製する。また, PS 結合蛋白である変異型 MFG-E8 (D89E)を投与し、エフェロサイトーシスを阻害することによって、病態に与える影響を解析する。脳梗塞においては神経症状(神経学スコア), 心筋梗塞においては超音波画像による心拍出機能, 腎動脈, 肝動脈結索再灌流においては、それぞれ ALT/AST などの肝逸脱酵素, BUN/Cre などの腎機能指標で解析する。

in situ hybridization増感システム (Mantra) を用いて、経時的に死細胞, 免疫細胞, 実質細胞, 間質細胞をそれぞれの特異抗体により多重染色する。また, RNA scopeを用いて、組織切片で遺伝発現を解析する。これらにより、死細胞, DAMPs, 炎症との時空間的関連について解析し、これらの分子の発現の時空間的变化に及ぼすCD300aの機能について明らかにする。さらに、エフェロサイトーシスを抑制するPS結合タンパクである変異型MFG-E8 (D89E)を投与することにより、これらの分子の発現の時空間的变化に及ぼすエフェロサイトーシスの役割を、申請者らの作業仮説に基づいて明らかにする。

GFP マウスを全身照射後, *TdTomato Lyz2-Cre* マウスあるいは *Cd300^{fl/fl} TdTomato Lyz2-Cre* マウスの骨髄を移植したキメラマウスを作成し、臓器虚血を誘導し、虚血局所の *TdTomato⁺* 単球のエフェロサイトーシスへの関与をフローサイトメトリーまたは免疫組織染色で解析する。さらに、心筋梗塞モデル, 肝臓, 腎臓の虚血再灌流モデルにおいても同様の解析を行い、その臓器特性と共通性を明らかにする。

(2) エフェロサイトーシスの制御による虚血障害の制御法の基盤開発

1) マウスモデルでの解析

研究代表者はすでに CD300a と PS との結合を阻害する抗 CD300a 中和抗体を樹立し、これを投与した MCAO モデルマウスでは、ペナンブラ領域の神経脱落や神経症状が著明に改善を示すことを明らかにした。さらに種々の投与スケジュールにより効果の比較を行う。また、これらの解析を心筋梗塞モデル, 肝臓, 腎臓の虚血再灌流モデルにおいても同様に行い、エフェロサイトーシスの亢進による臓器障害への影響を解析する。

2) ヒト化マウスモデルを用いたヒト外挿性の検証

研究代表者は、ヒト CD300A と PS との結合を遮断するマウス抗ヒト CD300A 中和抗体をすでに樹立した(p6 準備状況)。ヒト単球からマクロファージを誘導し、樹立した抗ヒト CD300A 中和抗体のエフェロサイトーシスの促進効果を検証するとともに、その分子機構をマウスとの対比で明らかにする。さらに in vivo での効果を検証するために、ヒト化マウスモデルを用いたヒト型虚血モデル(p6 準備状況)での検証を行う。さらに、シングルセル RNA シークエンスを用いた包括的、網羅的解析により、免疫細胞や神経細胞やグリア細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、エフェロサイトーシス, DAMPs, 炎症反応, 細胞死などの関与する遺伝子発現に対する抗マウス CD300a 中和抗体の作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 虚血臓器における組織障害の時空間的な病理像とその分子機構の解明

野生型マウス, CD300a 遺伝子欠損マウスで 脳梗塞モデル(MCAO), 心筋梗塞モデル (左前下降枝結索), 腎動脈, 肝動脈結索虚血再灌流モデルにおいて、変異型 MFG-E8 (D89E)によりエフェロサイトーシスを阻害すると、CD300a 遺伝子欠損マウスのそれぞれの臓器障害が増悪し、野生型マウスと同レベルとなったことから、CD300a 遺伝子欠損マウスではエフェロサイトーシスが亢進し、病態が軽減していることが証明された。組織学的、イオメーキング解析により、死細胞からの DAMPs が減少し、炎症による組織障害が改善していることも明らかにした。さらに、エフェロサイトーシスの亢進は脳では炎症性単球、心臓、腎臓では組織在住マクロファージが担っていることを明らかにした。

(2) エフェロサイトーシスの制御による虚血障害の制御法の基盤開発

CD300a と PS との結合を阻害する抗 CD300a 中和抗体を投与した MCAO モデルマウスでは、ペナンプラ領域の神経脱落や神経症状が著明に改善を示したが、心筋梗塞モデル, 肝臓, 腎臓の虚血再灌流モデルにおいてもエフェロサイトーシが亢進し、組織障害が軽減することを示した。さらに、ヒト CD300A と PS との結合を遮断するマウス抗ヒト CD300A 中和抗体をすでに樹立したが、これはヒト単球からマ誘導したマクロファージによるエフェロサイトーシスが亢進させた。ヒト化マウスモデルを用いた腎臓虚血再灌流モデルを作成し、これを投与すると、腎臓組織障害が軽減することを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura-Shinya Y, Iguchi-Manaka A, Murata R, Sato K, Van Vo A, Kanemaru K, Shibuya A, Shibuya K.	4. 巻 34
2. 論文標題 DNAM-1 promotes inflammation-driven tumor development via enhancing IFN- production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibuya A, Shibuya K	4. 巻 33
2. 論文標題 DNAM-1 versus TIGIT: competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immunol,	6. 最初と最後の頁 687-692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa Yuta, Kanemaru Kazumasa, Nakahashi-Oda Chigusa, Shibuya Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor-derived extracellular vesicles regulate tumor-infiltrating regulatory T cells via the inhibitory immunoreceptor CD300a	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.11.10.376715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Almeida M, Shibagaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibayama S, Shibuya A	4. 巻 579
2. 論文標題 An inhibitory immunoreceptor, Allergin-1, suppresses FITC-induced type 2 contact hypersensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBRC(Biochem Biophys Res Commun)	6. 最初と最後の頁 146-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.09.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakahashi-Oda C, Fujiyama S, Nakazawa Y, Kanemaru K, Wang Y, Lyu W, Shichita T, Kitaura J, Abe F, Shibuya A.	4. 巻 6
2. 論文標題 CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke”	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology (Sci Immunol),	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abe7915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iijima A, Kanemaru K, Wang Y, Nabekura T, Nakamura Y, Fujisawa Y, Mori D, Ohmuraya M, Yamasaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A.	4. 巻 561
2. 論文標題 Selective expression of a C-type lectin receptor, Clec12b, on skin mast cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBRC(Biochem Biophys Res Commun)	6. 最初と最後の頁 101-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.097.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Yamashita-Kanemaru Y, Abe F, Murata R, Nakamura-Shinya Y, Kanemaru K, Muratani M, Veillette A, Goto M, Ito M, Shibuya A, Shibuya K.	4. 巻 118
2. 論文標題 DNAM-1 regulates Foxp3 expression in regulatory T cells by interfering with TIGIT under inflammatory conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA,	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.20213091182021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita-Kanemaru Y, Oh-oka K, Abe F, Shibuya K, Shibuya A.	4. 巻 40
2. 論文標題 8.Yamashita-Kanemaru Y, Oh-oka K, Abe F, Shibuya K, Shibuya A. Suppression of Th1 and Th17 proinflammatory cytokines and upregulation of Foxp3 expression by a humanized anti-DNAM-1 monoclonal antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2020.0042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nabekura T, Shibuya A	4. 巻 54
2. 論文標題 ILC1: Guardians of the oral mucosa against enemy viruses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 196-198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.01.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nabekura T, Shibuya A	4. 巻 44
2. 論文標題 Type 1 innate lymphoid cells: Soldiers at the front line of immunity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Journal	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bj.2020.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugii N, Matsuda M, Okumura G, Shibuya A, Ishikawa E, Kaneda Y, Matsumura A.	4. 巻 112
2. 論文標題 HVJ-E containing PD-L1 siRNA inhibits immunosuppressive activities and elicits antitumor immune responses in glioma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 81-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------